

CHROM. 3881

### Dünnschichtchromatographisches Nachweisverfahren zur Charakterisierung von Barbituraten mit Doppelbindungen in der C-5-Seitenkette

Die allgemein gebräuchlichen chromatographischen Nachweisverfahren für Barbiturate: Quecksilber(I)-nitratlösung (BÄUMLER und Mitarb.<sup>1</sup>; DEININGER<sup>6</sup>), Zwicker- bzw. Murexid-Reaktion (STAHL<sup>14</sup>) geben keinen Aufschluss über die Natur der an C-5 vorliegenden Substituenten; es handelt sich vielmehr um Gruppenreaktionen (FRAHM<sup>7</sup>).

Zum Nachweis von Barbituraten mit Doppelbindungen in der C-5-Seitenkette sind 0.1 % bzw. 0.05 % Kaliumpermanganatlösungen angewandt worden (CHRISTENSEN und Mitarb.<sup>4</sup>; LEHMANN und Mitarb.<sup>9</sup>; SUNSHINE und Mitarb.<sup>15</sup>). Bromhaltige Barbitursäurederivate können mit Wasserstoffsuperoxid/Fluorescein-Reagens charakterisiert werden (WEICHSEL<sup>16</sup>).

Wir fanden bei der DC von Barbituraten, dass die Verbindungen dieser Stoffgruppe, welche ungesättigte Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen in der Seitenkette aufweisen, mit Fluorescein sichtbar gemacht werden, wenn das Chromatogramm vorher mit N-Bromsuccinimid behandelt worden ist.

#### *Material und Methode*

Die verwendeten Chemikalien stammten von der Fa. E. Merck AG (Darmstadt) und waren von der Qualität "Zur Analyse". N-Bromsuccinimid wurde von der Fa. Theodor Schuchert GmbH & Co. (München) bezogen.

Die Dünnschichtplatten (Grösse 200 × 200 mm) wurden nach dem Standardverfahren nach STAHL<sup>14</sup> mit Kieselgel G beschichtet.

Zum Auftragen der Substanzlösungen benutzten wir eine graduierte Mikropipette mit einem Fassungsvermögen von 10  $\mu$ l (Einteilung: 1  $\mu$ l). Die Substanzen waren in Chloroform oder in Chloroform-Methanol-Gemisch gelöst; die Lösungen enthielten 5  $\mu$ g Substanz pro  $\mu$ l.

Für die Betrachtung der Chromatogramme im U.V.-Licht verwendeten wir eine Camag-Universal-U.V.-Lampe; die Auswertung erfolgte im langwelligen Ultraviolett.

Fließmittel: Chloroform-Aceton (90:10) (BÄUMLER und Mitarb.<sup>1</sup>).

#### *Nachweis*

*Sprühlösung 1.* 0.4 g N-Bromsuccinimid werden in 100 ml Eisessig gelöst.

*Sprühlösung 2.* 0.01 g Fluorescein werden in 100 ml 96%igem Äthanol gelöst.

*Vorgang.* Die Platten werden mit der Sprühlösung 1 durchfeuchtet und dann 10 Min. auf 120° erhitzt. Nach Abkühlen der Platten werden diese mit der Sprühlösung 2 besprüht. Die Auswertung erfolgt bei Tageslicht und im langwelligen Ultraviolett.

Beim Besprühen des Chromatogramms mit der Fluoresceinlösung färbt sich die Platte rosarot, während die Substanzen als weisse Flecke mit einem rosaroten Rand zu sehen sind; wenn das Chromatogramm sofort nach dem Besprühen mit Lösung 2 im U.V.-Licht betrachtet wird, sieht man die Substanzen als tiefblaue Flecke auf gelbem Grund. Nach etwa 20 Min. sind die Substanzflecke intensiv gelb gefärbt und

TABELLE I

REAKTION DER UNTERSUCHTEN BARBITURATE UND THIOBARBITURATE MIT DEM N-BROMSUCCINIMID/FLUORESC EIN-REAGENS

| <i>Synonyma<sup>a</sup></i> | <i>Systematischer Name</i>   | <i>Reaktion mit N-Bromsuccinimid/Fluorescein-Reagens</i> |
|-----------------------------|--|--|
| Alloarbitral                | 5,5-Diallyl-barbitursäure  | positiv  |
| Alphenal                    | 5-Allyl-5-phenyl-barbitursäure   | positiv  |
| Amobarbital                 | 5-Äthyl-5-isopentyl-barbitursäure  | negativ  |
| Aprobarbital                | 5-Allyl-5-isopropyl-barbitursäure  | positiv  |
| Axeen                       | 5-Allyl-5-( $\beta$ -hydroxypropyl)-barbitursäure                        | positiv  |
| Barbital                    | 5,5-Diäthyl-barbitursäure  | negativ  |
| Brallobarbital              | 5-Allyl-5-(2-bromallyl)-barbitursäure                                    | positiv  |
| Butalbital                  | 5-Allyl-5-isobutyl-barbitursäure   | positiv  |
| Buthalital                  | 5-Allyl-5-isobutyl-2-thiobarbitursäure                                   | positiv  |
| Butobarbital                | 5-Äthyl-5-butyl-barbitursäure  | negativ  |
| Cyclobarbital               | 5-Äthyl-5-(1-cyclohexenyl)-barbitursäure                                 | positiv  |
| Cyclopal                    | 5-Allyl-5-(2-cyclopentenyl)-barbitursäure                                | positiv  |
| N,N'-Dimethylnealbarbital   | 5-Allyl-5-neopentyl-1,3-dimethyl-barbitursäure                           | positiv  |
| Dormovit                    | 5-Furfuryl-5-isopropyl-barbitursäure                                     | positiv  |
| Eldoral "Heyden"            | 5-Äthyl-5-piperidino-barbitursäure                                       | positiv  |
| Eunarcon                    | 5-( $\beta$ -Bromallyl)-5-isopropyl-1-methyl-barbitursäure               | positiv  |
| Hebaral                     | 5-Äthyl-5-hexyl-barbitursäure  | negativ  |
| Heptabarbum                 | 5-Äthyl-5-(1-cycloheptenyl)-barbitursäure                                | positiv  |
| Hexobarbital                | 5-Methyl-5-(1-cyclohexenyl)-1-methyl-barbitursäure                       | positiv  |
| Idobutal                    | 5-Allyl-5-butyl-barbitursäure  | positiv  |
| Inactin                     | 5-Äthyl-5- <i>sek.</i> -butyl-2-thiobarbitursäure                        | positiv  |
| Kalypnon                    | 5-Äthyl-5-crotyl-barbitursäure   | positiv  |
| Metharbital                 | 5,5-Diäthyl-1-methyl-barbitursäure                                       | negativ  |
| Methohexital                | $\alpha$ ( $\pm$ )-5-Allyl-5-(1-methyl-2-pentiny)-1-methyl-barbitursäure | positiv  |
| N-Methylnealbarbital        | 5-Allyl-5-neopentyl-1-methyl-barbitursäure                               | positiv  |
| Methylphenobarbital         | 5-Äthyl-5-phenyl-1-methyl-barbitursäure                                  | negativ  |
| Narconumal                  | 5-Allyl-5-isopropyl-1-methyl-barbitursäure                               | positiv  |
| Nealbarbital                | 5-Allyl-5-neopentyl-barbitursäure  | positiv  |
| Noctal                      | 5-( $\beta$ -Bromallyl)-5-isopropyl-barbitursäure                        | positiv  |
| Pentobarbital               | 5-Äthyl-5-(1-methylbutyl)-barbitursäure                                  | negativ  |
| Pernocton                   | 5-( $\beta$ -Bromallyl)-5- <i>sek.</i> -butyl-barbitursäure              | positiv  |
| Phenobarbital               | 5-Äthyl-5-phenyl-barbitursäure   | negativ  |
| Probarbital                 | 5-Äthyl-5-isopropyl-barbitursäure  | negativ  |
| Profundol                   | 5-Allyl-5- <i>sek.</i> -butyl-barbitursäure                              | positiv  |
| Propal                      | 5,5-Dipropyl-barbitursäure   | negativ  |
| Reposal "Novo"              | 5-Äthyl-5-bicyclo-(3,2,1)-2-octen-3-yl-barbitursäure                     | positiv  |
| Rutonal                     | 5-Methyl-5-phenyl-barbitursäure  | negativ  |
| Secbutabarbital             | 5-Äthyl-5- <i>sek.</i> -butyl-barbitursäure                              | negativ  |
| Secobarbital                | 5-Allyl-5-(1-methylbutyl)-barbitursäure                                  | positiv  |
| Sigmodal                    | 5-( $\beta$ -Bromallyl)-5-(1-methylbutyl)-barbitursäure                  | positiv  |
| Thiopental                  | 5-Äthyl-5-(1-methylbutyl)-2-thiobarbitursäure                            | positiv  |
| Thiotyr                     | 5,5-Diäthyl-2-thiobarbitursäure  | positiv  |
| Vinylbitalum                | 5-Vinyl-5-(1-methylbutyl)-barbitursäure                                  | positiv  |

<sup>a</sup> Soweit wie möglich wurden die von der Weltgesundheitsorganisation empfohlenen Freinamen gewählt (NEGWER<sup>11</sup>).

der Untergrund tiefblau; am Tageslicht dagegen erscheinen sie als rosarote Flecke auf weissem Untergrund. Die Substanzflecke sind noch nach einigen Stunden sichtbar.

### *Ergebnisse und Diskussion*

Wir untersuchten 43 Barbitursäurederivate (darunter vier Thiobarbiturate); sie sind in Tabelle I aufgeführt. Es zeigte sich, dass alle Substanzen dieser Verbindungsgruppe, die ungesättigte C-C-Bindungen in der C-5-Seitenkette aufweisen (alken-, allyl-, bromallyl-, cycloolefin- oder vinylsubstituierte Derivate) mit N-Bromsuccinimid/Fluorescein-Reagens nachweisbar sind. Sie können auf diese Weise eindeutig von den 5,5-Dialkyl- und 5-Alkyl-5-aryl-barbituraten unterschieden werden, die mit diesem Nachweisreagens keine Flecke ergeben. Die Derivate Dormovit (5-Isopropyl-5-furfuryl-barbitursäure) und Eldoral-“Heyden” (5-Äthyl-5-piperidino-barbitursäure) verhalten sich wie die Verbindungen mit olefinischen Doppelbindungen in der C-5-Seitenkette.

Mit dem N-Bromsuccinimid/Fluorescein-Reagens können weniger als 5 µg Substanz nachgewiesen werden.

Die Thiobarbiturate ergeben schon bei der Behandlung des Chromatogramms mit der Sprühhösung 1 eine gelbe bis gelbbraune Färbung. Nach Besprühen der Platte mit Lösung 2 zeigen auch die 5,5-dialkylierten Thioverbindungen Inactin, Thiopental und Thiotyr die Reaktion der Barbitursäuren, die einen Substituenten mit ungesättigter C-C-Bindung haben.

Auch andere Arzneistoffe, die nicht zu den Barbituraten gehören, können mit dem N-Bromsuccinimid/Fluorescein-Reagens nachgewiesen werden. Hierzu gehören die Derivate des Nicotinsäureamids (Bilamid, Lytosin, Nicethamid und Nicotinamid), die Purine (Coffein, Theobromin und Theophyllin), die Pyrazolone (Aminophenazon, Antipyrinaldehyd, Isopyrin, Jodopyrin und Phenazon), die Acetanilidderivate (Antifebrin, Lactophenin, Paracetamol und Phenacetin), sowie die Wirkstoffe Salicylamid, Persedon, Methaqualon und Ethinamate. Nach COOK<sup>5</sup> werden auch die schwefelhaltigen Insektizide der Gruppe der Phosphorsäureester mit einer Fluoresceinlösung in 1/10 N Natronlauge sichtbar gemacht, wenn man das Chromatogramm vorher mit einer Lösung von N-Bromsuccinimid in Methylchloroform behandelt. Weiterhin benutzen POPOV UND GADEBA<sup>12</sup> das N-Bromsuccinimid/Fluorescein-Reagens zum Nachweis von Vulkanisationsbeschleunigern; sie verwenden es in fast derselben Zusammensetzung wie wir zur Charakterisierung der Barbiturate mit olefinischen Doppelbindungen in der C-5-Seitenkette.

Unsere Untersuchungen zeigten ferner, dass die Bromureide (Bromisoval und Carbromal), die Hydantoine (Mephentoin, Pesomin und Phentoin), die Urethane (Meprobamat und Phenprobamat), sowie die Stoffe Bemegrade, Methypylon und Glutethimide mit dem N-Bromsuccinimid/Fluorescein-Reagens nicht nachgewiesen werden können.

Das Reagens zur Charakterisierung von ungesättigten C-C-Bindungen in der C-5-Seitenkette von Barbituraten wird nur in Verbindung mit den für diese Substanzen allgemein üblichen Nachweismethoden angewandt. Für eine sinnvolle Anwendung des N-Bromsuccinimid/Fluorescein-Reagens ist es unerlässlich die Spezifität des Barbituratnachweises mit dem jeweiligen Sprühreagens zu kennen. Nach chromatographischer Trennung wird der fragliche Stoff zuerst mit einem für Barbiturate gebräuchlichen Nachweisreagens besprüht. Beim positiven Barbituratnachweis

wird ein zweites Chromatogramm mit dem N-Bromsuccinimid/Fluorescein-Reagens behandelt, um festzustellen, ob die untersuchte Verbindung ungesättigte C-C-Bindungen aufweist.

Das N-Bromsuccinimid/Fluorescein-Reagens haben wir bei der Untersuchung von biologischem Material auf die Stoffwechselprodukte von bromallylsubstituierten Barbituraten bei Vergiftungen angewandt; diese Barbitursäurederivate werden im Körper in die 5-Acetyllderivate überführt (BOEDECKER und Mitarb.<sup>2,3</sup>; HALBERKANN und Mitarb.<sup>8</sup>; LUDWIG<sup>10</sup>). Sowohl das Bromallyl- als auch das Acetyllderivat kann mit der Quecksilber(I)-nitratlösung angefärbt werden, während mit dem N-Bromsuccinimid/Fluorescein-Reagens nur die Verbindungen mit dem Bromallylrest im Molekül nachweisbar sind; somit können die Abbauprodukte von den unveränderten Bromallylderivaten schnell differenziert und die durch die präparative DC isolierten Metabolite vor der I.R.-Untersuchung auf ihre Reinheit geprüft werden. Mit dem Quecksilber(I)-nitratreagens sind Spuren vom unveränderten Bromallylderivat in der Metabolitfraktion schwer feststellbar, während mit dem N-Bromsuccinimid/Fluorescein-Reagens diese auf einfache Weise nachgewiesen werden können.

Wegen der grossen Zahl der in pharmazeutischen Präparaten anzutreffenden Barbituratkombinationen dürfte—wie SAHLI und Mitarb.<sup>13</sup> erwähnten—kaum ein Fließmittel zu finden sein, das eine vollständige Trennung sämtlicher Barbiturate erlaubt. Das N-Bromsuccinimid/Fluorescein-Reagens erleichtert die Suche nach einem unbekanntem Barbiturat erheblich, indem es wertvolle Hinweise für den Ausschluss zahlreicher Verbindungen dieser Gruppe liefert. Daher stellt dieses Reagens in der chemisch-toxikologischen Praxis ein wertvolles Hilfsmittel dar.

*Institut für Gerichtliche Medizin der Universität Bonn,  
Stiftsplatz 12, 53 Bonn (Deutschland)*

S. GOENECHEA

- 1 J. BÄUMLER UND S. RIPPSTEIN, *Pharm. Acta Helv.*, 36 (1961) 382.
- 2 FR. BOEDECKER UND H. LUDWIG, *Med. Klin. (Munich)*, 22 (1926) 1230.
- 3 FR. BOEDECKER UND H. LUDWIG, *Arch. Exptl. Pathol.*, 139 (1929) 351.
- 4 E. K. J. CHRISTENSEN, TH. VOS UND T. HUIZINGA, *Pharm. Weekblad*, 100 (1965) 517.
- 5 J. W. COOK, *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 37 (1954) 984, 987 und 989; zit. in: *C.A.*, 49 (1955) 2665b.
- 6 R. DEININGER, *Arzneimittel-Forsch.*, 54 (1955) 472.
- 7 M. FRAHM, *Deut. Med. Wochschr.*, 91 (1966) 81.
- 8 J. HALBERKANN UND F. REICHE, *Münch. Med. Wochschr.*, 74 (1927) 1450.
- 9 J. LEHMANN UND V. KARAMUSTAFAOGLU, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 14 (1962) 554.
- 10 H. LUDWIG, *Münch. Med. Wochschr.*, 100 (1958) 194.
- 11 M. NEGWER, *Organische Arzneimittel und ihre Synonyma*, Akademie-Verlag, Berlin, 1966.
- 12 A. POPOV UND V. GADEBA, *J. Chromatog.*, 16 (1964) 256.
- 13 M. SAHLI UND M. OESCH, *J. Chromatog.*, 14 (1964) 526.
- 14 E. STAHL, *Dünnschichtchromatographie*, 2. Aufl., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1967.
- 15 I. SUNSHINE, E. ROSE UND J. LEBEAU, *Clin. Chem.*, 9 (1963) 312.
- 16 H. WEICHEL, *Mikrochim. Acta*, No. 2 (1965) 325.

Eingegangen am 1. November 1968; geänderte Fassung am 25. November 1968